

RÉSOLUTION OIV-OENO 632-2021

TECHNIQUES ANALYTIQUES ET DE CONTRÔLE microbiologique : ANALYSES COMMUNES À TOUTES LES MONOGRAPHIES

AVERTISSEMENT : Cette résolution amende les résolutions suivantes :

- OENO 17/2003
- OIV-OENO 328-2009
- OIV-OENO 329-2009

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

VU L'ARTICLE 2, paragraphe 2 b) iv de l'Accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

SUR PROPOSITION du Groupe d'experts « Microbiologie »,

CONSIDÉRANT la nécessité de mettre à jour les techniques analytiques et de contrôle microbiologique,

DÉCIDE de réorganiser et modifier les paragraphes 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 de la fiche F-COEI-2-CONBAC du *Codex œnologique international* comme suit (la fiche F-COEI-2-CONBAC contient plusieurs pages, seules les sept premières pages apparaissent dans ce projet de résolution puisque les modifications à apporter ne concernent que les sept premières pages de la fiche :

1. Réhydratation préalable des levures (*Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*) : LSA (Levures sèches actives), AFY (Levures congelées), COY (Levures compressées), CRY (Crème de levure), ENY (Levures encapsulées et levures immobilisées), « levain de tirage ».

Peser stérilement, environ 10 g de préparation (noter le poids exact pour le calcul final de la concentration) ;

Ajuster stérilement à 100mL dans de l'eau peptonée saline et stérile* à 20-37 °C ou selon les indications du fabricant ;

Homogénéiser doucement à l'aide d'un barreau, d'un stomacher ou d'un agitateur magnétique pendant 5 min ;

Arrêter l'agitation et laisser reposer pendant 20 minutes, à une température ambiante de 20-30 °C ;

Homogénéiser de nouveau à température ambiante pendant 5 min ;

sous conditions stériles, préparer des dilutions décimales en série dans de l'eau ou de l'eau peptonée saline et stérile* et procéder aux contrôles microbiologiques sur la solution mère homogénéisée.

Dans le cas des levains de tirage utilisés pour les vins effervescents, prélever stérilement 1 mL, préparer des dilutions décimales en série dans l'eau ou de l'eau peptonée saline et stérile* et procéder aux contrôles microbiologiques sur la solution mère homogénéisée.

* Solution peptone-sel : peptone bactériologique : 1 g/L ; chlorure de sodium : 8,5 g/L, pH final : 7,0.

2. Réhydratation préalable des préparations de bactéries lactiques

Peser stérilement, environ 10 g de solution de bactéries lactiques (noter le poids exact pour le calcul final de la concentration) ;

Sous conditions stériles, ajuster à 100 mL avec de l'eau peptonée saline et stérile* (25 °C) ;

Homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique ou d'un stomacher pendant 5 min ;

Arrêter l'agitation et laisser reposer pendant 20 min à température ambiante (20-30 °C) ;

Homogénéiser de nouveau pendant 5 min à température ambiante ;

Sous conditions stériles, préparer des dilutions décimales en série dans de l'eau ou de l'eau peptonée saline et stérile* et procéder aux contrôles microbiologiques.

* Solution peptone-sel : peptone bactériologique : 1 g/L ; chlorure de sodium : 8,5 g/L, pH final : 7,0.

3. Contrôle microbiologique d'autres produits dans le *Codex œnologique international* :

Produits pour lesquels le contrôle des levures et/ou des bactéries, et/ou moisissures est requis.

Peser stérilement environ 10 g du produit œnologique à contrôler (noter le poids exact pour le calcul final de la concentration) ;

Sous conditions stériles, ajuster à 100 mL avec de l'eau peptonée saline et stérile* ;
Homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique ou d'un stomacher pendant 5 min ;
Sous conditions stériles, préparer des dilutions décimales en série dans de l'eau ou de l'eau peptonée saline et stérile* et procéder aux contrôles microbiologiques.

* Solution peptone-sel : peptone bactériologique : 1 g/L ; chlorure de sodium : 8,5 g/L, pH final : 7,0.

4. Dénombrement des levures totales

Milieu YM (MALT WICKERHAM) gélifié

Agar-agar bactériologique	15 g
Extrait de levure	3 g
Extrait de malt	3 g
Peptone	5 g
Glucose	10 g
Eau	q.s.p. 1000 mL

YPD

Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
Glucose	20 g
Agar-agar	10 g
Eau	q.s.p. 1000 mL

Juste après la préparation, le milieu est autoclavé à 120 °C pendant 20 min.

En cas de temps d'incubation prolongé, ajouter du chloramphénicol à une

concentration finale de 100 mg/L afin de prévenir la croissance bactérienne.

Après ensemencement avec les dilutions d'échantillon appropriées permettant d'atteindre 30-300 colonies, les boîtes sont incubées à 25 - 30°C en aérobie pendant 48 à 72 heures.

Compter le nombre d'UFC dans les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies et rapporter au poids de matière sèche.

En complément des milieux proposés, tout milieu équivalent internationalement reconnu pour la culture de ces micro-organismes peut être utilisés.

5. Dénombrement des levures non-*Saccharomyces*

5.1. Milieu lysine

Les levures sont cultivées dans un milieu lysine dont la composition est la suivante :

Agar-agar	20 g
Monohydrochlorure de L-lysine	5 g
Glucose	1 g
Pourpre de bromocrésol	0,015 g
Eau	q.s.p. 1000 mL
Ajuster	pH 6,8 ± 0,2

Porter à ébullition pendant 1 min afin de garantir une dissolution complète, puis passer à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min.

En cas de temps d'incubation prolongé, ajouter du chloramphénicol à une concentration finale de 100 mg/L afin de prévenir la croissance bactérienne.

Après ensemencement avec les dilutions de l'échantillon, les boîtes sont incubées à 25 °C ou 30 °C pendant 48 à 96 heures.

Compter le nombre d'UFC (boîtes entre 30 et 300 colonies) et rapporter au poids de matière sèche.

En complément des milieux proposés, tout milieu équivalent internationalement reconnu pour la culture de ces micro-organismes peut-être utilisés.

5.2. Milieu YPD additionné de cycloheximide à 10 mg/L et incubation 6-7 jours en aérobiose

En cas de temps d'incubation prolongé, ajouter du chloramphénicol à une concentration finale de 100 mg/L afin de prévenir la croissance bactérienne.

6. Dénombrement des bactéries lactiques revivifiables

MRS (Man, Rogosa et Sharpe) modifié

Les bactéries sont cultivées dans un milieu MRS (Man, Rogosa, Sharpe 1960), additionné de jus de tomate, dont la composition est la suivante :

Agar agar	15 g
Bacto-peptone	10 g
Extrait de viande	8 g
Extrait de levure	4 g
Acétate de sodium	5 g
K_2HPO_4	2 g
Citrate trisodique	2 g
$MgSO_4$ à 100mg/L	2.5 mL
$MnSO_4$ à 20mg/L	2 mL
Tween 80	1 mL
Acide DL-Malique	5 g
Jus de tomate*	200 mL
Glucose	20 g ou glucose : 10 g + fructose : 10 g
HCl ou NaOH q.s.p. pH	4,8

Eau distillée q.s.p.

1000 mL q.s.p (quantité suffisante pour)

*Le jus de tomate est destiné à améliorer la croissance des bactéries lactiques.
Préparation : jus de tomate commercial (sans additifs) ou fait maison, centrifugé à 4000 g pendant 20 min et filtré si nécessaire ; utiliser le jus clair.

Autoclavage à 110°C pendant 20 min

Au moment du coulage du milieu dans la boîte de Petri, additionner de la pimarcine à une concentration finale de 10 mg/L afin d'inhiber les levures et les moisissures

Incubation à 25 °C pendant 8 à 10 jours en anaérobiose

En complément des milieux proposés, tout milieu équivalent internationalement reconnu pour la culture de ces micro-organismes peut être utilisés.

7. Dénombrement des moisissures

Milieu Czapek-Dox gélosé

Agar agar	15 g
Saccharose	30 g
NaNO_3	3 g
K_2HPO_4	1 g
MgSO_4	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO_4	0.01 g
Eau	q.s.p. 1000 mL
Ajuster	pH 7

Autoclavage à 120 °C pendant 20 min

Ajouter directement dans la boîte de Petri contenant le milieu du chloramphénicol à une concentration finale de 100 mg/L afin d'inhiber les bactéries.

Incuber à 20 °C pendant 10 jours en aérobiose.

En complément des milieux proposés, tout milieu équivalent internationalement reconnu pour la culture de ces micro-organismes peut être utilisés.

8. Dénombrement des bactéries acétiques

Agar-agar bactériologique	20 g
Extrait de levure	5 g
Acides aminés de caséine	5 g
Glucose	10 g
Adjust à	pH 4.5
Eau	q.s.p 1000 mL

Autoclavage à 120°C pendant 20min.

Lors de l'ajout dans la boîte de Petri, additionner au milieu de la pimarinine à une concentration finale de 100 mg/L afin d'inhiber les levures et les moisissures, ainsi que de la pénicilline à une concentration finale de 12,5 mg/L afin d'inhiber les bactéries lactiques.

Incuber à 25 °C pendant 4 jours en aérobiose.

En complément des milieux proposés, tout milieu équivalent internationalement reconnu pour la culture de ces micro-organismes peut être utilisés.